โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษโดยสารสกัดเกสรผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* จากเรณูข้าวโพดหวาน *Zea mays*
The inhibiting activity of foodborne pathogenic bacteria by bee pollen extract of European honeybee *Apis mellifera* from pollen of sweet corn *Zea mays*

ชื่อนิสิต นางสาวอรณัชชา จำลอง **เลขประจำตัว** 6032064123

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษโดยสารสกัดเกสรผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* จากเรณูข้าวโพดหวาน *Zea mays*

The inhibiting activity of foodborne pathogenic bacteria by bee pollen extract of European honeybee *Apis mellifera* from pollen of sweet corn *Zea mays*

นางสาวอรณัชชา จำลอง

อาจารย์ที่ปรึกษา
ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษโดยสารสกัดเกสรผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* จากเรณูข้าวโพดหวาน *Zea mays*
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวอรณัชชา จำลอง
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมนุษย์ได้รับความเสี่ยงในการเป็นโรคอาหารเป็นพิษสูง ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหาร โดยยารักษาโรคอาหารเป็นพิษทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคเพื่อลดอาการข้างเคียงลง เกสรผึ้ง คือ ผลิตภัณฑ์อย่างหนึ่งของผึ้งที่เก็บจากเรณูดอกไม้ อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพมากมาย ทั้งนี้ผู้วิจัยสนใจเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน *Zea mays* และจากเรณูชา *Camellia sinensis* เนื่องจากเรณูข้าวโพดหวานและเรณูชามีคุณสมบัติทางการแพทย์หลายอย่าง ด้วยเหตุผลที่กล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ โดยเลือกศึกษาใน *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* และใช้สารสกัดหยาบเกสรผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* จากเรณูข้าวโพดหวาน และเรณูชา เริ่มการสกัดหยาบโดยใช้เกสรผึ้ง 20 g ละลายในเมทานอล 200 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น ทำการปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาทำการระเหยแห้งโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C ได้สารสกัดหยาบที่เหนียวหนืด สีเหลืองอมน้ำตาลเข้ม โดยสารสกัดหยาบจากเรณูข้าวโพดหวานมี yield เท่ากับ 19.8% และจากเรณูชามี yield เท่ากับ 16.1% นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay โดยนำสารสกัดหยาบเกสรผึ้งมาเตรียมให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ (0, 62, 125, 250, 500 และ 1000 mg/ml) โดยใช้ dimethyl sulfoxide, ใช้ยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin (penn/strep) เป็น positive control, ทำการเพาะเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ใน *Luria*-Bertani *broth* (LB broth) ที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากทำการเกลี่ยเชื้อ (100 μl) ลงบน LB agar plate, นำ paper disc ที่มีสารสกัดอย่างหยาบที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ หรือ penn/strep มาวางบน agar และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผลของบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (clear zone) จากผลการทดลองไม่พบ clear zone ของ *E. coli* และ *S. aureus* จากทุกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งด้วยเมทานอล ในขณะที่พบว่า penn/strep สามารถยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดี มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone เฉลี่ยขนาด 3.03 และ 2.53 cm ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) *และ* Post hoc test สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05) ผลจากงานวิจัยในครั้งนี้เป็นข้อมูลสำคัญในการพิจารณาการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาเป็นแนวทางในการสร้างทางเลือกต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร และการประยุกต์ไปเป็นยารักษาโรคอาหารเป็นพิษ

คำสำคัญ: แบคทีเรีย เกสรผึ้ง สารสกัดหยาบ เรณูข้าวโพดหวาน เรณูชา

Research Title	: The inhibiting activity of foodborne pathogenic bacteria by bee pollen extract of European honeybee *Apis mellifera* from pollen of sweet corn *Zea mays*
Student name	: Miss Onnatcha Jumlong
Advisor	: Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.
Co-Advisor	:
Department of	: Biology

Abstract

Currently, humans are at high risk of foodborne disease, which is mainly caused by the bacterial contamination. Foodborne disease medications can cause side effects. Thus, natural products were interesting to be applied in the treatment of disease to diminish side effects. Bee pollen is one of bee products which workers collect from floral pollen, which is rich in phenolic compounds and flavonoids with many reported bioactivities. In this work, bee pollen from sweet corn (*Zea mays*) and tea (*Camellia sinensis*) were focused due to their medical properties. For the reasons mentioned above, inhibiting activity of foodborne pathogenic bacteria was in our interest. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were representative. Crude extracts of *Apis mellifera* bee pollen from pollen of sweet corn and tea were used. Bee pollen (20 g) was initially dissolved in 200 mL methanol. The mixture had been incubated at room temperature (RT) for 48 h in the dark. Later, it was spun at 6,000 rounds/min (rpm), 4°C for 15 min. Then, the supernatant was collected and evaporated by a rotary evaporator at 40 °C. Both crude extracts were sticky and looked yellow and dark brown. The yield of crude extract from sweet corn bee pollen was 19.8% and of tea bee pollen was 16.1%. The antibacterial activity was tested by disc diffusion assay. Crude extract was prepared in various concentrations of 0, 62, 125, 250, 500 and 1000 mg/mL by dimethyl sulfoxide. The solution of penicillin and streptomycin (penn/strep) was used as positive control. *E. coli* and *S. aureus* was cultured in Luria-Bertani broth (LB broth) at 100 rpm, 37 °C for 12 h. After the culture (100 μL) was spread onto an LB agar plate, a paper disc containing crude extract of various concentrations or penn/strep was put onto the agar. It was incubated at 37 °C for 12 h. Triplication of experiments was done. Clear zone of inhibition was recorded. The result showed that there was no clear zone of *E. coli* and

S. aureus from all concentrations of crude methanol extracts of both bee pollens. In contrast, penn/strep was very potential in inhibiting the growth of *E. coli* and *S. aureus*, with the average diameter of clear zones of 3.03 and 2.53 cm, respectively. Due to one-way variance analysis (One-Way ANOVA) and Post hoc test, both crude extracts could not significantly inhibit the growth of *E. coli* and *S. aureus* (P=0.05). This obtained data are fundamental in considering the use of natural products as an alternative to inhibit foodborne pathogenic bacteria and its application to treat food borne disease.

Keywords: bacteria, bee pollen, crude extract, sweet corn pollen, tea pollen

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้คำแนะนำ และการช่วยเหลือมาโดยตลอดทั้งกระบวนการทำวิจัย ตั้งแต่เริ่มคิดหัวข้อ จัดหาอุปกรณ์ วางแผนการทดลอง ให้ความรู้เกี่ยวกับวิธีทำการทดลองในขั้นตอนต่าง ๆ และให้คำปรึกษาในการแก้ไขปัญหาต่างๆขณะทำโครงการ ตรวจสอบความถูกต้อง และแก้ไขปรับปรุงรูปเล่มรายงานให้มีความสมบูรณ์ รวมทั้งอนุคราะห์ห้องปฏิบัติการทดลอง อุปกรณ์ ตัวอย่างแบคทีเรีย และเกสรผึ้งที่ใช้ในการทำวิจัย ตลอดจนสั่งสอน ให้ข้อคิด และเป็นให้กำลังใจจนทำให้โครงการนี้สามารถดำเนินไปได้อย่างราบรื่น และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณนางสาวพรรณทิวา คงคารัตน์ พี่ที่กำลังศึกษาในระดับปริญญาเอกที่ทำวิจัยในห้องปฏิบัติการที่ให้คำแนะนำในการทำปฏิบัติการ และการใช้อุปกรณ์ รวมถึงนางสาวกัณธิดา ภมรพล นางสาวกนกวรรณ ตั้งสิริพัฒนาพันธ์ และนางสาวอาภาศิริ นพรัตน์ ซึ่งเป็นเพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติการของศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า อีกทั้งขอขอบพระคุณครอบครัว และเพื่อนทุกคนในภาควิชาชีววิทยาที่คอยสนับสนุน ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และให้กำลังใจตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้จนทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า อาจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา อาจารย์ ดร.มารุต เฟื่องอาวรณ์ และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชาโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก
ABSTRACT ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ 2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 3
2.1. แบคทีเรีย 3
2.1.1. ประเภทของแบคทีเรีย 4
2.1.2. แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร 4
2.1.3. การรักษาโรคอาหารเป็นพิษ 6
2.2. ผึ้งพันธุ์ 6
2.2.1. เกสรผึ้ง 7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 8
3.1. การเก็บตัวอย่างเกสรผึ้ง 8
3.2. การสกัดหยาบเกสรผึ้ง 8
3.3. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 9
3.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 9
3.4.1. การเตรียมความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง 9
3.4.2. ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay 9
3.4.3. การวัดบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (clear zone) 10
3.5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 10
บทที่ 4 ผลการศึกษา 11
4.1. ผลการสกัดหยาบเกสรผึ้ง 11
4.1.1. สารสกัดหยาบจากเรณูข้าวโพดหวาน 11
4.1.2. สารสกัดหยาบจากเรณูชา 11

4.2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเกสรผึ้ง 11
4.2.1. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E. coli* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน 11
4.2.2. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน 12
4.2.3. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E. coli* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูชา 12
4.2.4. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ต่อเกสรผึ้งเรณูชา 13
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา 15
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 16
6.1. สรุปผลการศึกษา 16
6.2. ข้อเสนอแนะ 16
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ 16
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต 16
เอกสารอ้างอิง 17
ภาษาอังกฤษ 17
ภาคผนวกที่ 1 ผลการทดลองฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง 24
ภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์เชิงสถิติในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง 26

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ค่า mean±s.d.(cm) ของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียต่อ positive control.....14

ตารางที่ 2 ผลการทดลองฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งที่ความเข้มข้นต่างๆ.....24

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกข้าวโพดหวาน.....26

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least-Significant Different (LSD) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกข้าวโพดหวาน.....26

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกชา.....28

ตารางที่ 6 ตารางการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least-Significant Different (LSD) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกชา.....28

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกข้าวโพดหวาน.....30

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least-Significant Different (LSD) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกข้าวโพดหวาน.....30

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกชา.....32

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least-Significant Different (LSD) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกชา.....32

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างของแบคทีเรีย....3
ภาพที่ 2 *E. coli*....5
ภาพที่ 3 *S. aureus*....5
ภาพที่ 4 ผึ้งพันธุ์....7
ภาพที่ 5 การระเหยแห้งสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง....8
ภาพที่ 6 ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง....9
ภาพที่ 7 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay....9
ภาพที่ 8 การวัดบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (CLEAR ZONE) 10
ภาพที่ 9 บริเวณยับยั้งของ *E. coli* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน....12
ภาพที่ 10 บริเวณยับยั้งของ *S. aureus* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูข้าวหวาน....12
ภาพที่ 11 บริเวณยับยั้งของ *E. coli* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูชา....13
ภาพที่ 12 บริเวณยับยั้งของ *S. aureus* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูชา....13

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ปัจจุบันมนุษย์ได้รับความเสี่ยงในการเป็นโรคอาหารเป็นพิษสูง โดยมีรายงานพบการเกิดโรค อัตราส่วน 1:10 ของมนุษย์ทั่วโลก โดยโรคอาหารเป็นพิษเกิดจากสาเหตุหลัก คือ การปนเปื้อนแบคทีเรียในอาหาร เช่น *Salmonella spp., Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholerae* โดยสามารถเกิดการปนเปื้อนได้ในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิตอาหาร การจัดส่ง การจัดเก็บที่ไม่ถูกสุขลักษณะ และการบริโภค ซึ่งสามารถปนเปื้อนแบคทีเรียผ่านสิ่งแวดล้อมหลายรูปแบบ เช่น ในน้ำ ดิน หรืออากาศ ทั้งนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาใน *Escherichia coli* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ และ *Staphylococcus aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกมาศึกษาในงานวิจัยนี้ ผู้ป่วยที่เป็นโรคอาหารเป็นพิษจะมีอาการโดยทั่วไป ได้แก่ มีไข้ คลื่นไส้ อาเจียนร่วมกับอาการปวดท้อง ท้องเสียรุนแรง อุจจาระเป็นมูกเลือด หรือในบางกรณีที่มีความรุนแรง ได้แก่ ความเสียหายของสมองและเส้นประสาท และไตวาย hemolytic uremic syndrome (HUS) และอาจส่งผลต่อการเสียชีวิตได้ โดยปัญหาสาธารณสุขนี้ส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิต เศรษฐกิจ การท่องเที่ยว และการค้าทั่วโลก (World Health Organization [WHO], 2020)

การรักษาโรคโดยยารักษาโรคอาหารเป็นพิษที่มีอาการรุนแรงทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ อาจพบอาการท้องผูก คลื่นไส้ เวียนศีรษะ ง่วงนอน แต่ในการรักษาที่เข้มข้นมากขึ้น จะใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาซึ่งอาจส่งผลข้างเคียงที่รุนแรงมากขึ้น เช่น อาการคลื่นไส้ อาเจียน และท้องเสียที่รุนแรง รวมถึงอาการปวดหัว ปวดท้อง คัน และผื่น โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะกลุ่ม Fluoroquinolone เช่น ยา ciprofloxacin (Cipro) และ levofloxacin (Levaquin) อาจทำให้เกิดความเสียหายของเส้นเอ็น กล้ามเนื้อ และข้อต่อได้ ผู้วิจัยจึงเห็นถึงความสำคัญ และต้องการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคอาหารเป็นพิษเพื่อลดอาการข้างเคียงดังกล่าวลง (Food and Drug Administration[FDA], 2018; Mathews et al., 2019)

เกสรผึ้ง คือ ผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งของผึ้งที่เก็บจากเรณูดอกไม้ อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพมากมาย (Komosinska-Vassev et al., 2015) และมีงานวิจัยอื่นๆที่ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของเกสรผึ้งจากเรณูของดอกไม้ต่างๆ เช่น จากดอกทานตะวัน *Helianthus annuus L.* (Fatrcová-Šramková et al., 2016) ดอกไม้รวมหลายชนิด (Kacaniova, 2014) พบว่าสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูที่กล่าวข้างต้นสามารถยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดได้ อีกทั้งยังมีการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์จากสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง

จากเรณูดอกทับทิมด้วยเมทานอล พบว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella dysantriae* และ *Salmonella spp.* (Mahboubi, Asgarpanah, & Sadaghiyani, 2015) ทั้งนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน *Zea mays* และจากเรณูชา *Camellia sinensis* เนื่องจากเรณูข้าวโพดหวานและเรณูชามีคุณสมบัติทางการแพทย์หลายอย่าง เช่น ช่วยกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดระดับไขมันในเลือด และอื่นๆ (Hamao et al., 2011; Pan et al., 2017)

การนำผลิตภัณฑ์ของผึ้ง เช่น น้ำผึ้ง เกสรผึ้ง พรอพอลิส ไขผึ้ง และนมผึ้ง มาใช้ประโยชน์ในด้านเครื่องสำอาง อาหาร และยารักษาโรคได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีงานวิจัยที่มีการศึกษาอย่างละเอียดมากขึ้น ซึ่งชนิดผึ้ง หรือปัจจัยที่เกี่ยวข้องอื่นๆที่แตกต่างกันก็ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ของผึ้งจะมีองค์ประกอบ คุณสมบัติ และประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน โดยงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบของเกสรผึ้งส่วนใหญ่ที่ผ่านมาเป็นการนำสารสกัดหยาบของเกสรผึ้งจากผึ้งพันธุ์ในต่างประเทศมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย แต่ยังมีงานวิจัยน้อยมากที่ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดเกสรผึ้งพันธุ์ในภูมิภาคเอเชีย รวมทั้งในประเทศไทย ด้วยเหตุนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะทำการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมมากยิ่งขึ้น อีกทั้งข้อมูลที่ได้เหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการพิจารณาในการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาเป็นแนวทางในการสร้างทางเลือกต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ และการประยุกต์ไปเป็นยารักษาโรคอาหารเป็นพิษ รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียให้มีคุณภาพสูงขึ้นต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

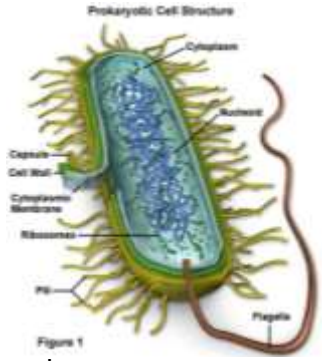
ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยสารสกัดเกสรผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* จากเรณูข้าวโพดหวาน *Zea mays* และเรณูชา *Camellia sinensis*

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1. แบคทีเรีย

แบคทีเรีย (Bacteria) คือ จุลินทรีย์ที่เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่เป็นเซลล์แบบโปรแคริโอต (Prokaryotic cell) พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ และอากาศ (Doron & Gorbach, 2008)

โครงสร้างทั่วไปของแบคทีเรียประกอบด้วยผนังเซลล์ (Cell wall) ซึ่งมีเปปทิโดไกลแคนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ โดยผนังเซลล์มีหน้าที่รักษารูปร่างของแบคทีเรียให้คงที่ เยื่อหุ้มเซลล์ (Cytoplasmic membrane) เป็นโครงสร้างที่ทำให้สามารถแยกตัวเซลล์ออกจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เยื่อหุ้มเซลล์มีหน้าที่ควบคุมการแลกเปลี่ยนสารอาหาร และน้ำเพื่อรักษาความสมดุลในการดำรงชีวิต และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารบางชนิด เช่น ฟอสฟอลิพิด เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบออร์กาเนลล์ ได้แก่ 70s ไรโบโซม และแกรนูลต่างๆ รวมถึงพบนิวคลีออยด์ที่ประกอบด้วยเส้นใย DNA ทั้งนี้ยังพบโครงสร้างที่บริเวณผิว (Surface structure) ได้แก่ แฟลกเจลลา ทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่ และพิไล (Pili) หรือฟิมเบร (Fimbriae) ทำหน้าที่ในการยึดเกาะกับเซลล์ของโฮสท์ แบคทีเรียบางชนิดยังสามารถสร้างแคปซูล และสร้างสปอร์เพื่อทนต่อสภาพสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Salton & Kim, 1996)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของแบคทีเรีย

(https://micro.magnet.fsu.edu/cells/bacteriacell.html)

แบคทีเรียบางชนิดมีประโยชน์ เช่น ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตโยเกิร์ต ชีส และผักดอง อีกทั้งยังช่วยตรึงไนโตรเจน ย่อยสลายเซลลูโลส โดยแบคเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศน์ แต่มีแบคทีเรียบางชนิดอาจทำให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิตได้ ทั้งในพืช สัตว์ และมนุษย์ เช่น ก่อโรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์ เป็นต้น (Rogers & Kadner, 2020)

2.1.1. <u>ประเภทของแบคทีเรีย</u>

การจำแนกประเภทของแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้จากลักษณะที่ใช้เป็นเกณฑ์ที่แตกต่างกัน เช่น ใช้ลักษณะรูปร่างเป็นเกณฑ์ ซึ่งโดยทั่วไปจะแบ่งเป็น 3 แบบ คือ ทรงกลม (Sphere) เรียกว่า ค็อกคัส (Coccus) หรือค็อกไค (Cocci) ทรงกระบอก (Rod) เรียกว่า บาซิสลัส (Bacillus) หรือ บาซิลไล (Bacili) และรูปเกลียว (Spiral) เรียกว่า สไปริลลัม (Spirillum) หรือสไปริลไล (Spirilli) และแบคทีเรียยังสามารถจำแนกตามการตอบสนองของการเจริญเติบโตในการมีหรือไม่มีออกซิเจน โดยแบ่งออกเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีออกซิเจน (Aerobic bacteria) แบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีออกซิเจน (Anaerobic bacteria) และแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มี และไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic bacteria) ทั้งนี้ยังใช้การย้อมสีแกรม โดยแบ่งได้เป็นประเภทแกรมบวก และแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกจะมีผนังเซลล์ค่อนข้างหนา ซึ่งประกอบด้วยเปปทิโดไกลแคนเป็นส่วนใหญ่ แต่แบคทีเรียแกรมลบจะมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นเปปทิโดไกลแคนที่บาง และแบคทีเรียแกรมลบจะมี inner membrane และ outer membrane ด้วยองค์ประกอบที่แตกต่างกันนี้ ส่งผลให้แบคทีเรียส่งผลต่อยาปฏิชีวนะแตกต่างกัน (Salton & Kim, 1996; Costerton, Ingram, & Cheng, 1974; Doron & Gorbach, 2008)

2.1.2. <u>แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร</u>

แบคทีเรียที่มักก่อโรคทางเดินอาหารที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Cronobacter sakazakii*, *Esherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococccus aureus*, *Vibrio spp.* และ *Yersinia enterocolitica* (Bintsis, 2017)

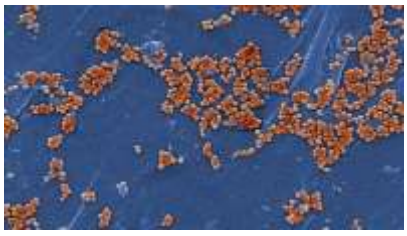
Escherichia coli (*E. coli*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน โดยสภาวะที่มีค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตเท่ากับ 6-8 (Mitscherlich & Marth, 1984) การแพร่กระจายของเชื้อมักเกิดจากการปนเปื้อนของอาหาร และน้ำ (García, Fox, & Besser, 2010) สามารถจำแนกชนิดของ *E. coli* ตามกลไกที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ : (1) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC); (2) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ Shiga toxin producing *E. coli* [STEC]; (3) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC); (4) Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC); (5) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC); และ (6) Attaching and Effacing *E. coli* (A/EEC) (Croxen et al., 2013) โดยมีรายงานว่าการติดเชื้อ STEC อาจทำให้เกิดอาการท้องเสียเล็กน้อยถึงรุนแรงและ 5-10% ของการติดเชื้อ แต่สามารถพัฒนาเป็น Hemolytic

Uremic Syndrome (HUS) ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง และนำไปสู่การเกิดไตวายและเสียชีวิตได้ (Scallan et al., 2011)

ภาพที่ 2 *E. coli*

(https://www.bbc.com/news/health-13639241)

Staphylococccus aureus (*S. aureus*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะทรงกลมโดยเรียงตัวคล้ายคูโซ่สั้น บางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารพิษโปรตีนที่มีความเสถียรสูงที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยในมนุษย์ (FDA, 2012) มีการเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (Bacon & Sofos, 2003) เป็นแบคทีเรียชนิดที่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้มาก (FDA, 2012) *S. aureus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 7 ถึง 47.8 °C แบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ในสภาวะ pH 4.5 - 9.3 และทนต่อสภาวะที่มีความเค็มสูง (International Commission on Microbiological Specifications for Foods [ICMSF], 1996) *S. aureus* สามารถทำให้ติดเชื้อ โดยมักปนเปื้อนมากับอาหาร เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ หรือน้ำ ซึ่งเชื้อจะมีระยะฟักตัวในมนุษย์ตั้งแต่ 6 - 10 ชั่วโมง จึงเริ่มแสดงอาการ ได้แก่ อาเจียน คลื่นไส้ ปวดท้อง ปวดศีรษะ วิงเวียนศีรษะ หนาวสั่น เหงื่อออก อ่อนเพลีย ปวดกล้ามเนื้อ และท้องเสียอาจมีมูกเลือดร่วมด้วย *S. aureus* สามารถสร้างสารพิษ enterotoxin ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม pyrogenic toxin (Bacon & Sofos, 2003)



ภาพที่ 3 *S. aureus*

(https://news.uchicago.edu/story/staphylococcus-aureus-bacteria-turns-immune-system-against-itself)

2.1.3. <u>การรักษาโรคอาหารเป็นพิษ</u>

การรักษาโรคอาหารเป็นพิษสามารถทำได้โดยการรักษาตามอาการ หรือการป้องกันการสูญเสียน้ำ ส่วนการรักษาโรคอาหารเป็นพิษที่มีอาการรุนแรง หรือเรื้อรังมักจะใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโดยมักจะใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม fluoroquinolone (Guerrant et al., 2001) การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะสามารถลดระยะเวลาของการเกิดอาการของโรคทางเดินอาหารได้โดยเฉพาะยา Ciproflox-acin ในกลุ่ม fluoroquinolone (Castro, Navarro, & Biot, 2013) โดยยาปฏิชีวนะนี้จะไปรบกวนกระบวนการจำลอง DNA และการถอดรหัสของ DNA ผ่านการยับยั้ง DNA gyrase หรือ topoisomerase II และ DNA topoisomerase IV ของแบคทีเรีย ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ (Strahilevitz et al., 2009) โดยยาปฏิชีวนะในกลุ่ม fluoroquinolone จะส่งผลข้างเคียงต่อกระดูก เส้นเอ็น กล้ามเนื้อ และระบบประสาทส่วนกลางอีกด้วย (FDA, 2016)

2.2. ผึ้งพันธุ์

ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ย่อยอย่างน้อย 20 ชนิด สายพันธุ์ย่อยของผึ้งพันธุ์ได้แพร่กระจายอย่างกว้างขวาง เนื่องจากผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจที่เกี่ยวข้องกับการผสมเกสรและการผลิตน้ำผึ้ง (Ellis & Ellis, 2012) ผึ้งพันธุ์มักจะกระจายตัวในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย ผึ้งพันธุ์จะสร้างรังแบบเปิดในที่โล่ง และมีดเช่นเดียวกับ *Apis cerana* (Akratanakul, 1976; Maa, 1953; Otis, 1990) การเลี้ยงผึ้งพันธุ์สำหรับการผลิตน้ำผึ้งเป็นส่วนสำคัญของการเกษตรของประเทศไทย ซึ่งมักถูกใช้สำหรับการผสมเกสรของลิ้นจี่ ทุเรียน เงาะ และพืชอื่น ๆ (Crane, 1990; Seely, 1985) ปัจจุบันมีการศึกษาผลิตภัณฑ์ของผึ้งผึ้งพันธุ์ในด้านอุตสาหกรรมโภชนาการ และเภสัชกรรม หนึ่งในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ คือ เกสรผึ้ง (Roman, 2006) เกสรผึ้ง คือ ละอองเกสรของดอกไม้ ซึ่งจะถูกเก็บโดยใช้กับดักละอองเกสร และมูลค่าของละอองเกสรที่เก็บเกี่ยวอาจถูกเพิ่มเข้าไปในรายได้รวมของผู้เลี้ยงผึ้ง (Karem & Rasha, 2013)

ภาพที่ 4 ผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera*
(https://antropocene.it/en/2018/10/28/apis-mellifera)

2.2.1. เกสรผึ้ง

ปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์ผึ้ง (น้ำผึ้ง นมผึ้ง พรอพอลิส ขี้ผึ้ง และเกสรผึ้ง) กำลังได้รับความนิยมในการศึกษาเนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ (Sattler et al., 2015) เกสรผึ้ง คือ ละอองเรณูของดอกไม้ที่ถูกนำมาผสมกับน้ำผึ้ง และน้ำลาย ซึ่งเก็บไว้ที่ขาคู่หลังของผึ้ง แล้วนำมาไว้ที่รังเพื่อเป็นอาหาร (Pascoal et al., 2014) ส่วนประกอบที่สำคัญของเกสรผึ้ง คือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ แร่ธาตุ วิตามิน สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และอาจจะพบสเตอรอล และเทอร์พีนร่วมด้วย (Feás et al., 2012) อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบของเกสรผึ้งนั้นขึ้นอยู่กับต้นกำเนิดของพืช และปัจจัยอื่นๆ เช่น สภาพภูมิอากาศ ชนิดของดิน กิจกรรมผู้เลี้ยงผึ้ง และกระบวนการเก็บรักษาที่แตกต่างกันในการผลิตเชิงพาณิชย์ (Pascoal et al., 2014) สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลชีพ โรคเบาหวาน ไขมันในเลือดสูง หรือการอักเสบ แต่มีความโดดเด่นจากหลายงานวิจัยพบว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย และมีรายงานพบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติในการต่อต้านการแพ้ การอักเสบ จุลินทรีย์ มะเร็ง รวมถึงเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน (Ares, Nozal, & Bernal, 2013)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1. การเก็บตัวอย่างเกสรผึ้ง

เก็บตัวอย่างเกสรผึ้งโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lau และคณะโดยใช้กับดักเกสรผึ้ง โดยเมื่อผึ้งบินผ่านรูของกับดักเกสรผึ้ง เกสรผึ้งจะหลุดจากขาหลังของผึ้งลงไปที่ภาชนะรองรับด้านล่าง โดยจะเก็บรักษาตัวอย่างเกสรผึ้งไว้ในที่แห้ง อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง ซึ่งตัวอย่างเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวานได้รับความอนุเคราะห์จากเจริญฟาร์ม จ.สระบุรี ประเทศไทย และเกสรผึ้งจากเรณูชาจากห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ของศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

3.2. การสกัดหยาบเกสรผึ้ง

สกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน และเรณูชาโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Mohdaly และคณะ โดยนำตัวเกสรผึ้งมาสกัดหยาบโดยใช้เกสรผึ้งอย่างละ 20 g ละลายในเมทานอล 200 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น ทำการปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาทำการระเหยแห้งโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C จากนั้นนำสารสกัดหยาบเกสรผึ้งที่ได้มาชั่งน้ำหนัก แล้วเก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 5 การระเหยแห้งสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง

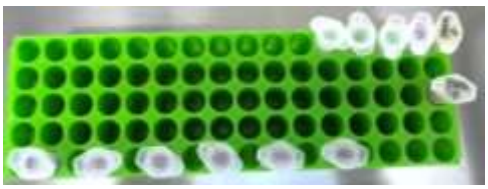
3.3. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

การเพาะเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Luria*-Bertani *broth* (LB broth) ที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ โดยแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้รับความอนุเคราะห์จากจากห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ของศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

3.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

3.4.1. การเตรียมความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง

นำสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน และเรณูชามาเตรียมให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0(control), 62, 125, 250, 500 และ 1000 mg/ml โดยใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) และใช้ยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin (penn/strep) เป็น positive control



ภาพที่ 6 ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน

3.4.2. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay โดยดัดแปลงวิธีของ Kirby–Bauer เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 100 μl ที่เพาะเลี้ยงไว้ ลงบน LB agar plate จากนั้นนำ paper disc ที่มีสารสกัดอย่างหยาบที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0(control), 62, 125, 250, 500 และ 1000 mg/ml รวมถึง penn/strep (positive control) มาวางบน agar แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ภาพที่ 7 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay

3.4.3. การวัดบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (clear zone)

วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นโดยผ่าน paper disc ที่มีสารสกัดอย่างหยาบของความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง หรือ penn/strep

ภาพที่ 8 การวัดบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (clear zone)

3.5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวานและเรณูชาโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และ Post Hoc Test โดยใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least-Significant Different (LSD) ผ่านโปรแกรม IBM SPSS version 22

บทที่ 4
ผลการศึกษา

ผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 หัวข้อหลัก ดังนี้

ส่วนที่ 4.1 ผลการสกัดหยาบเกสรผึ้ง นำเสนอผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน และเรณูชา โดยกล่าวถึงลักษณะทางกายภาพ และร้อยละของผลผลิต (% yeild)

ส่วนที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย นำเสนอประสิทธิภาพของการยับยั้งแบคทีเรียต่อสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง โดยกล่าวถึงความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียต่อสารสกัดหยาบเกสรผึ้งที่ความเข้มข้นต่างๆ และ penn/strep(positive control)

4.1.ผลการสกัดหยาบเกสรผึ้ง

4.1.1. <u>สารสกัดหยาบจากเรณูข้าวโพดหวาน</u>

จากการสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวานโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายพบว่าได้สารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวานมีลักษณะเหนียวหนืด สีเหลืองปนน้ำตาล และมีร้อยละของผลผลิต (% yeild) เท่ากับ 19.8%

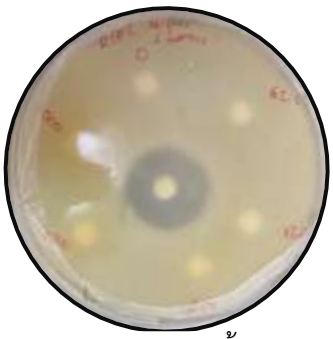
4.1.2. <u>สารสกัดหยาบจากเรณูชา</u>

จากการสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูชาโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายพบว่าสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูชามีลักษณะเหนียวหนืด สีน้ำตาลปนเหลือง และมีร้อยละของผลผลิต (% yeild) เท่ากับ 16.1%

4.2.ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเกสรผึ้ง

4.2.1. <u>ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E. coli* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน</u>

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay พบว่าไม่พบบริเวณยับยั้งของ *E. coli* จากทุกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวานด้วยเมทานอล ในขณะที่พบว่า positive control สามารถยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* ได้ดี โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 3.33 cm



ภาพที่ 9 บริเวณยับยั้งของ *E. coli* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน

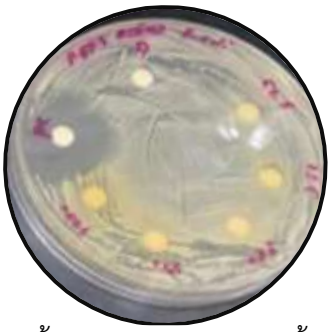
4.2.2. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay พบว่าไม่พบบริเวณยับยั้งของ *S. aureus* จากทุกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวานด้วยเมทานอล ในขณะที่พบว่า positive control สามารถยับยั้งการเติบโตของ *S. aureus* ได้ดี โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 2.07 cm

ภาพที่ 10 บริเวณยับยั้งของ *S. aureus* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน

4.2.3. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E. coli* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูชา

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay พบว่าไม่พบบริเวณยับยั้งของ *E. coli* จากทุกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูชาด้วยเมทานอล ในขณะที่พบว่า positive control สามารถยับยั้งการเติบโตของ *E. coli* ได้ดี โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 2.73 cm



ภาพที่ 11 บริเวณยับยั้งของ *E. coli* ต่อเกสรผึ้งจากเรณูชา

4.2.4. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ต่อเกสรผึ้งเรณูชา

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay พบว่าไม่พบบริเวณยับยั้งของ *S. aureus* จากทุกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูชาด้วยเมทานอล ในขณะที่พบว่า positive control สามารถยับยั้งการเติบโตของ *S. aureus* ได้ดี โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 3.00 cm

ภาพที่ 12 บริเวณยับยั้งของ *S. aureus* ต่อเกสรผึ้งเรณูชา

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองผลทางสถิติดังแสดงในภาคผนวก พบว่าค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งของ *E. coli* และ *S. aureus* ต่อสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวานและเรณูชาที่มีความเข้มข้น 0, 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 mg/ml มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่าเท่ากับ 0 cm แต่ค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งของทุกความเข้มข้นที่กล่าวข้างต้นแตกต่างจาก penn/strep (positive control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่ามากที่สุด โดยแสดงค่าความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียทั้งสองชนิดต่อ penn/strep (positive control) ในตารางที่ 1 และสามารถสรุปผลได้ว่าสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน และเรณูชาไม่มีฤทธิ์ต้าน *E. coli* และ *S. aureus*

ตารางที่ 1 ค่า mean±s.d.(cm) ของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียต่อ positive control

penn/strep (positive control)		
ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดของสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง	mean±s.d.(cm)
E. coli	เรณูข้าวโพดหวาน	3.33±0.29
E. coli	เรณูชา	2.73±0.12
S. aureus	เรณูข้าวโพดหวาน	2.07±0.12
S. aureus	เรณูชา	3.00±0.20

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

เกสรผึ้ง เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากผึ้งที่ประกอบด้วยประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยับยั้งการเจริญของฟังใจ ไวรัส แบคทีเรีย มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย จากงานวิจัยของคุณ Komosinska และคณะใน ปี 2015 รายงานอีกว่าสารสกัดหยาบเกสรผึ้งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ แหล่งที่มาของพืช ภูมิศาสตร์ ชนิดของแบคทีเรีย ตัวทำละลายสารสกัดหยาบ พร้อมกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น สภาพภูมิอากาศ ประเภทดิน การแข่งขันของผึ้ง และกิจกรรมของผึ้ง จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ *E. coli* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ และ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกพบว่าสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน และเรณูชาโดยใช้เมทานอลเป็นทำละลายไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสองชนิด ซึ่งผลการทดสอบไม่พบฤทธิ์ต้าน *S. aureus* จากสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกไม้รวมในรัฐ Parana ด้วยเอทานอลในประเทศบราซิลเช่นเดียวกัน (Carpes et al., 2007)

ชนิดของตัวทำละลาย และความเข้มข้นของตัวทำละลายในการสกัดหยาบเกสรผึ้งที่แตกต่างก็ส่งผลต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยน้ำ เอทานอล และเมทานอล เป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้กันมากที่สุดสำหรับการสกัดละอองเกสรผึ้ง แต่มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการสกัดหยาบเกสรผึ้งโดยใช้เอทานอลเพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีประสิทธิภาพดีที่สุด (Kroyer & Hegedus, 2001; Fatrcová-Šramková et al., 2013) โดยมีงานวิจัยที่ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 40%-90% พบว่าการสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกไม้รวมจากรัฐ Alagoas ในระเทศบราซิลโดยใช้ 70% เอทานอลเป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุดจากเอทานอลทุกความเข้มข้น (Carpes et al., 2007)

แบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อเกสรผึ้งมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างของผนังเซลล์ทางเคมีที่ซับซ้อน โดยมีโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบที่เป็นตัวกำหนดสารต้านการเป็นพิษ และการเกิดโรคของจุลินทรีย์ นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรียชนิดนี้มีปริมาณไขมันสูงกว่าแบคทีเรียในแกรมบวก อีกทั้งแบคทีเรียแกรมลบยังมีพบ outer membrane และ inner membrane ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกมี membrane เพียงชั้นเดียวส่งผลให้ให้แบคทีเรียแกรมลบมีความทนทานต่อสารสกัดหยาบเกสรผึ้งมากกว่า ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ของผึ้งชนิดอื่นๆ ได้แก่ น้ำผึ้ง และพรอพอลิส และมีรายงานว่าการยับยั้งจุลชีพเกี่ยวข้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Estevinho et al., 2008)

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาโดยสารสกัดเกสรผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* จากเรณูข้าวโพดหวาน *Zea mays* และเรณูชา *Camellia sinensis* ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* แสดงให้เห็นว่า แม้เกสรผึ้งจะเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้องคำนึงปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น แหล่งที่มาของพืช ชนิดของแบคทีเรีย ตัวทำละลายสารสกัดหยาบ เป็นต้น

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. <u>ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์</u>

ผลจากงานวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลสำคัญในการพิจารณาการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาเป็นแนวทางในการสร้างทางเลือกต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร และการประยุกต์ไปเป็นยารักษาโรคอาหารเป็นพิษ โดยการเลือกใช้เกสรผึ้งนั้นต้องพึงระวังถึงแหล่งที่มาของเรณูเกสรผึ้ง และการสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นต้น

6.2.2. <u>ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต</u>

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเกสรผึ้งในครั้งนี้ อาจจะมีการศึกษาองค์ประกอบของเกสรผึ้งเพิ่มเติม รวมถึงมีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์กับฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย รวมถึงมีการตรวจสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) เพิ่มเติมจากวิธีการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางจากบริเวณยับยั้งเพื่อให้ได้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และในอนาคตอาจมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย หรือการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น กิจกรรมของผึ้ง เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

ภาษาอังกฤษ

Akratanakul, P. (1976). Honeybees in Thailand. American bee journal 116, 120-121.

Ares, A. M., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2013). Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. *Journal of chromatography*, *1313*, 78–95. doi: 10.1016/j.chroma.2013.07.051

Bacon, R.T. & Sofos, J.N. (2003). Characteristics of biological Hazards in foods. In: Schmidt, R.H., Rodrick, G.E., editors. *Food Safety Handbook.* New Jersey: John Wiley & Sons, 157–195.

Biemer, J. J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby–Bauer disc diffusion method annals of clinical and laboratory science, 3, 135-140.

Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS microbiology*, *3*(3), 529–563. doi:10.3934/microbiol.2017.3.529

Carpes, S. T., Begnini, R., De Alencar, S. M. & Masson, M. L. (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant, and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia*, 31: 1818–1825. doi: 10.1590/S1413-70542007000600032

Castro, W., Navarro, M., & Biot, C. (2013). Medicinal potential of ciprofloxacin and its derivatives. *Future medicinal chemistry*, *5*(1), 81–96. doi: 10.4155/fmc.12.181

Costerton, J. W., Ingram, J. M., & Cheng, K. J. (1974). Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriological reviews*, *38*(1), 87–110. doi: 10.1128/br.38.1.87-110.1974

Crane, E. (1990). Managing other bees for honey production, Bees and beekeeping science, practice, and world resource. New York: Cornell University. 274-284.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, *26*(4), 822–880. doi: 10.1128/CMR.00022-13

Doron, S., & Gorbach, S. L. (2008). Bacterial Infections: Overview. *International Encyclopedia of Public Health*, 273–282. doi: 10.1016/B978-012373960-5.00596-7

Ellis, J.D. & Ellis, A. (2012). *Apis mellifera* scutellata lepeletier (Insecta: Hymenoptera: Apis). Featured creatures.

Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., & Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *46*(12), 3774–3779.

Evgeny, V. (2020). The structure, territorial relationships and ecology of birds in Daghestan. *Journal of Wildlife and Biodiversity, 4*(1), 8-17. doi:10.22120/jwb.2019.113176.1097

Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Máriássyová M. & Kačániová M. (2016). Biologically active antimicrobial and antioxidant substances in the *Helianthus annuus L*. bee pollen, *Journal of Environmental Science and Health*, Part B, 51(3), 176-181. doi: 10.1080/03601234.2015.1108811

Feás, X., Vázquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., & Iglesias, A. (2012). Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *17*(7), 8359–8377. doi: 10.3390/molecules17078359

Food and Drug Administration, (2012). Bad bug book, Foodborne pathogenic microorganism, and natural toxins. Second Edition [Online]. Available from: https://www.fda.gov/Food/FoodborneIllness Contaminants/ CausesOfIllness BadBugBook/ [2020, June 20]

Food and Drug Administration, (2016). FDA updates warnings for fluoroquinolone antibiotics. [online]. Available from: https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-updates-warnings-fluoroquinolone-antibiotics [2020, June 17]

Food and Drug Administration, (2018). Foodbourne desease. [online]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety [2020, June 10]

García, A., Fox, J.G., & Besser, T.E. (2010). Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: A one health perspective. ILAR journal, 51(3), 221-32. doi: 10.1093/ilar.51.3.221.

Guerrant, R. L., Van Gilder, T., Steiner, T. S., Thielman, N. M., Slutsker, L., Tauxe, R. V., Hennessy, T., Griffin, P. M., DuPont, H., Sack, R. B., Tarr, P., Neill, M., Nachamkin, I., Reller, L. B., Osterholm, M. T., Bennish, M. L., & Pickering, L. K. (2001). Infectious diseases society of America. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *32*(3), 331–351.

Hamao, M., Matsuda H., Nakamura, S., Nakashima, S., Semura, S., Maekubo, S., Wakasugi, S., & Yoshikawa M., (2011). Anti-obesity effects of the methanolic extract and chakasaponins from the flower buds of Camellia sinensis in mice, Bioorganic & Medicinal chemistry, 19, 6033-6041. doi: 10.1016/j.bmc.2011.08.042

International Commission on Microbiological Specifications for Foods, (1996). *Micro-organisms in foods 5, Characteristics of Microbial Pathogens.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 1996.

Kacaniova, M. (2014). Antimicrobial activity of bee collected pollen against Clostridia. Animal science. Biotechnology. 47, 362–365.

Karem M. M. & Rasha A. S. (2013), Evaluation of pollen collected by honeybee, *Apis mellifera L*. colonies at Fayoum Governorate, Egypt. Part 1: Botanical origin, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *12*(2), 129-135. doi: 10.1016/j.jssas.2012.09.003

Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Ka**Ź**mierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee Pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 297425. doi: 10.1155/2015/297425

Lau, P., Bryant, V., Ellis, J. D., Huang, Z. Y., Sullivan, J., Schmehl, D. R., Cabrera, R. J., & Rangel, J. (2019). Seasonal variation of pollen collected by honey bee (*Apis mellifera*) in developed areas across four regions in the United States. PLoS ONE 14(6): e0217294. doi: 10.1371/journal.pone.0217294

Mohdaly, A. A., Mahmoud, A. A., Roby, M. H., Smetanska, I., & Ramadan, M. F. (2015). Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal Food Biochem*. *39*(4): 538-547. doi: 10.1111/jfbc.12160

Maa, T. C. (1953). An inquiry into the systematics of the Tribus Apidini or honeybees (hymenoptera). Treubia 21, 525-640.

Mahboubi, A., Asgarpanah, J., Sadaghiyani, P. N., & Faizi, M. (2015). Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of Punica granatum L. var.

pleniflora flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases. *BMC complementary and alternative medicine*, *15*, 366. doi: 10.1186/s12906-015-0887-x

Mathews, B., Thalody A. A., Miraj S. S., Kunhikatta V., Rao M., & Saravu K. (2019). Adverse effects of fluoroquinolones. A retrospective cohort study in a South Indian Tertiary Healthcare Facility. Antibiotics, 8(3), 104. doi: 10.3390/antibiotics8030104

Mitscherlich, E. & Marth, E.H., Microbial survival in the environment: Bacteria and rickettsiae important in human and animal health. Berlin: Springer-Verlag; 1984.

Otis, G. W. (1990). Diversity of Apis in Southeast Asia. In G. K. Vearesh, B. Malik, & H. Viraktanathan, Social insects and environment, 725-726.

Pan, Q., Xu, Y., Li, K., Peng, Y., Zhan, W., Li, W., Li, L., & Yan, J. (2017). The genetic basis of plant architecture in 10 Maize recombinant inbred line populations. *Plant Physiology*, *175*(2), 858-873. doi: org/10.1104/pp.17.00709

Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *63*, 233–239. doi: 10.1016/j.fct.2013.11.010

Rogers, K. & Kadner, R. J. (2020). Bacteria. Encyclopedia Britannica. Available from: https://www.britannica.com/science/bacteria

Roman, A. (2006). Effect of pollen load size on the weight of pollen harvested from honeybee colonies (Apis mellifera L). Journal of Apicultural Science. *50*(2): 47-57.

Salton, M.R.J. & Kim, K.S. (1996). Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 2. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8477/

Sattler, J. A. G., de Melo, I. L. P., Granato, D., Araújo, E., da Silva de Freitas, A., Barth, O. M., Sattler, A., & de Almeida-Muradian, L. B. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Research International*, *77*, 82-91.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging infectious diseases*, *17*(1), 7–15. doi: 10.3201/eid1701.p11101

Seely, T. D. (1985). Labour Specialization by Workers. Honeybee Ecology. Prinecton: New Jersy. pp. 31-35.

Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., & Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical microbiology reviews*, *22*(4), 664–689. doi: 10.1128/CMR.00016-09

Wenning, C.J. (2003). Pollen and the honeybee. *American Bee Journal*, 134, 394-397.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ผลการทดลองฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง

ผลการทดลอง

ตารางที่ 2 ผลการลองฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งที่ความเข้มข้นต่างๆ

ฤทธิ์การยับยั้ง *E.coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน			
conc.(mg/ml)	rep1(cm)	rep2(cm)	rep3(cm)
pc	3	3.5	3.5
0	0	0	0
62.5	0	0	0
125	0	0	0
250	0	0	0
500	0	0	0
1000	0	0	0
ฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูข้าวโพดหวาน			
conc.(mg/ml)	rep1(cm)	rep2(cm)	rep3(cm)
pc	2	2	2.2
0	0	0	0
62.5	0	0	0
125	0	0	0
250	0	0	0
500	0	0	0
1000	0	0	0
ฤทธิ์การยับยั้ง *E.coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูชา			
conc.(mg/ml)	rep1(cm)	rep2(cm)	rep3(cm)
pc	2.6	2.8	2.8

0	0	0	0
62.5	0	0	0
125	0	0	0
250	0	0	0
500	0	0	0
1000	0	0	0
ฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูชา			
conc.(mg/ml)	rep1(cm)	rep2(cm)	rep3(cm)
pc	2.8	3.2	3
0	0	0	0
62.5	0	0	0
125	0	0	0
250	0	0	0
500	0	0	0
1000	0	0	0

ภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์เชิงสถิติในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดหยาบเกสรผึ้ง

ผลการวิเคราะห์เชิงสถิติการทดลองฤทธิ์การยับยั้ง *E.coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกข้าวโพดหวาน

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกข้าวโพดหวาน

ANOVA

inhibitionzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27.778	5	5.556	400.000	.000
Within Groups	.167	12	.014		
Total	27.944	17			

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least-Significant Different (LSD) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกข้าวโพดหวาน

Multiple Comparisons

Dependent Variable: inhibitionzone

LSD

(I) concbeepollen	(J) concbeepollen	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
pc	62.5	3.3333*	.0962	.000	3.124	3.543
	125	3.3333*	.0962	.000	3.124	3.543
	250	3.3333*	.0962	.000	3.124	3.543
	500	3.3333*	.0962	.000	3.124	3.543
	1000	3.3333*	.0962	.000	3.124	3.543
62.5	pc	-3.3333*	.0962	.000	-3.543	-3.124
	125	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	250	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	500	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	1000	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
125	pc	-3.3333*	.0962	.000	-3.543	-3.124
	62.5	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	250	.0000	.0962	1.000	-.210	.210

	500	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	1000	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
250	pc	-3.3333*	.0962	.000	-3.543	-3.124
	62.5	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	125	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	500	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	1000	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
500	pc	-3.3333*	.0962	.000	-3.543	-3.124
	62.5	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	125	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	250	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	1000	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
1000	pc	-3.3333*	.0962	.000	-3.543	-3.124
	62.5	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	125	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	250	.0000	.0962	1.000	-.210	.210
	500	.0000	.0962	1.000	-.210	.210

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ผลการวิเคราะห์เชิงสถิติการทดลองฤทธิ์การยับยั้ง *E.coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกชา

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกชา

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.211	6	3.202	1681.000	.000
Within Groups	.027	14	.002		
Total	19.238	20			

ตารางที่ 6 ตารางการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least-Significant Different (LSD) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกชา

Multiple Comparisons

Dependent Variable: clearzone

LSD

					95% Confidence Interval	
(I) conc	(J) conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
pc	0	2.73333*	.03563	.000	2.6569	2.8098
	125	2.73333*	.03563	.000	2.6569	2.8098
	250	2.73333*	.03563	.000	2.6569	2.8098
	500	2.73333*	.03563	.000	2.6569	2.8098
	1000	2.73333*	.03563	.000	2.6569	2.8098
	62.5	2.73333*	.03563	.000	2.6569	2.8098
0	pc	-2.73333*	.03563	.000	-2.8098	-2.6569
	125	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	250	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	500	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	1000	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	62.5	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
125	pc	-2.73333*	.03563	.000	-2.8098	-2.6569
	0	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	250	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	500	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	1000	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764

	62.5	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
250	pc	-2.73333*	.03563	.000	-2.8098	-2.6569
	0	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	125	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	500	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	1000	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	62.5	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
500	pc	-2.73333*	.03563	.000	-2.8098	-2.6569
	0	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	125	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	250	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	1000	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	62.5	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
1000	pc	-2.73333*	.03563	.000	-2.8098	-2.6569
	0	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	125	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	250	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	500	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	62.5	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
62.5	pc	-2.73333*	.03563	.000	-2.8098	-2.6569
	0	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	125	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	250	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	500	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	1000	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ผลการวิเคราะห์เชิงสถิติการทดลองฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกข้าวโพดหวาน

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกข้าวโพดหวาน

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.983	6	1.830	961.000	.000
Within Groups	.027	14	.002		
Total	11.010	20			

ตารางที่ 8 ตารางการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least-Significant Different (LSD) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกข้าวโพดหวาน

Multiple Comparisons

Dependent Variable: clearzone

LSD

					95% Confidence Interval	
(I) conc	(J) conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
pc	0	2.06667*	.03563	.000	1.9902	2.1431
	125	2.06667*	.03563	.000	1.9902	2.1431
	250	2.06667*	.03563	.000	1.9902	2.1431
	500	2.06667*	.03563	.000	1.9902	2.1431
	1000	2.06667*	.03563	.000	1.9902	2.1431
	62.5	2.06667*	.03563	.000	1.9902	2.1431
0	pc	-2.06667*	.03563	.000	-2.1431	-1.9902
	125	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	250	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	500	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	1000	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	62.5	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
125	pc	-2.06667*	.03563	.000	-2.1431	-1.9902
	0	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	250	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	500	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	1000	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764

	62.5	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
250	pc	-2.06667*	.03563	.000	-2.1431	-1.9902
	0	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	125	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	500	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	1000	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	62.5	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
500	pc	-2.06667*	.03563	.000	-2.1431	-1.9902
	0	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	125	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	250	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	1000	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	62.5	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
1000	pc	-2.06667*	.03563	.000	-2.1431	-1.9902
	0	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	125	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	250	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	500	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	62.5	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
62.5	pc	-2.06667*	.03563	.000	-2.1431	-1.9902
	0	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	125	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	250	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	500	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764
	1000	.00000	.03563	1.000	-.0764	.0764

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ผลการวิเคราะห์เชิงสถิติการทดลองฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกชา

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกชา

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.143	6	3.857	675.000	.000
Within Groups	.080	14	.006		
Total	23.223	20			

ตารางที่ 10 ตารางการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least-Significant Different (LSD) ของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเกสรผึ้งจากเรณูดอกชา

Multiple Comparisons

Dependent Variable: clearzone

LSD

(I) conc	(J) conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
pc	0	3.00000*	.06172	.000	2.8676	3.1324
	125	3.00000*	.06172	.000	2.8676	3.1324
	250	3.00000*	.06172	.000	2.8676	3.1324
	500	3.00000*	.06172	.000	2.8676	3.1324
	1000	3.00000*	.06172	.000	2.8676	3.1324
	62.5	3.00000*	.06172	.000	2.8676	3.1324
0	pc	-3.00000*	.06172	.000	-3.1324	-2.8676
	125	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	250	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	500	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	1000	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	62.5	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
125	pc	-3.00000*	.06172	.000	-3.1324	-2.8676
	0	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	250	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	500	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	1000	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	62.5	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324

250	pc	-3.00000*	.06172	.000	-3.1324	-2.8676
	0	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	125	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	500	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	1000	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	62.5	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
500	pc	-3.00000*	.06172	.000	-3.1324	-2.8676
	0	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	125	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	250	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	1000	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	62.5	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
1000	pc	-3.00000*	.06172	.000	-3.1324	-2.8676
	0	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	125	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	250	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	500	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	62.5	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
62.5	pc	-3.00000*	.06172	.000	-3.1324	-2.8676
	0	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	125	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	250	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	500	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324
	1000	.00000	.06172	1.000	-.1324	.1324

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.